CE

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clone AE1/AE3 Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS053

English

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, Clone AE1/AE3, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of tumors as carcinoma or epithelial origin (1-3). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and explanation

Cytokeratins are a family of water-soluble proteins with molecular weights between 40-70 kDa that form the cytoskeleton of epithelial cells. At least 19 different cytokeratins have been identified and can be divided into two subfamilies. Subfamily A comprises relatively acidic cytokeratins (with a pH under 5.5) whereas members of subfamily B have a relatively basic pH of 6 or over.

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN_3.

Clone: AE1/AE3 Isotype: IgG1, kappa

Immunogen

Human epidermal callus (1)

Specificity

AE1/AE3 is a cocktail of two monoclonal antibodies that were obtained by immunizing mice with human callus keratins (2). AE1/AE3 has been shown to identify the majority of human cytokeratins and thus may be used as a tool for the positive IHC identification of cells of simple and stratified epithelial origin (1,2,4). Antibody AE1 immunoreacts with an antigenic determinant present on most of the subfamily A cytokeratins, including cytokeratins with Moll's designation (4) 10, 13, 14, 15 16 and 19 (MWs of 56.5, 54', 50, 50', 48 and 40 kDa, respectively) but not on Nos. 12, 17 and 18 (55, 47 and 45 kDa) (4). Antibody AE3 reacts with an antigenic determinant shared by the subfamily B cytokeratins including Nos. 1 and 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 (MWs of 65, 67, 64, 59, 58, 56, 54 and 52 kDa, respectively) (5).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010/K8014).

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide.

Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010/K8014). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010).

Paraffin-embedded sections: As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 uL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 uL dispense volume)

Autoprogram (without counterstaining): panCK or Autoprogram (with counterstaining): panCKH

The Auxiliary step should be set to “rinse buffer” in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to “none.” This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator’s Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in “Performance characteristics.”

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include squamous mucosa and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “Performance characteristics” in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic.

Performance characteristics

Normal tissues: Testing of 30 different normal tissues demonstrated positive staining in the cytoplasm of squamous and columnar epithelium of the cervix, colon, esophagus, skin, small intestine, stomach and tonsil. Other tissues that stained included glandular tissue (mammary, parathyroid, prostate sweat and thyroid), astrocyte, white matter of the cerebellum, glial filaments of the cerebrum, distal tubule and Bowman’s capsule of the kidney, bile duct, pneumocytes, bronchi, mesothelium, interlobular duct of the pancreas, anterior pituitary cell, interlobular duct and acinar cells of the salivary gland, reticular cells and Hassall’s bodies of the thymus, and endometrium and smooth muscle of the uterus (6). Negative staining was noted for adrenal, bone marrow, heart, pericardium, peripheral nerve, skeletal muscle, spleen and testis.

AE1/AE3 reacts with keratinized (56.5/65-67) and corneal (55/64) epidermis, stratified squamous epithelia of internal organs (51/59), stratified epithelia (50/58), hyperproliferative keratinocytes (48/56) and simple epithelia (45/52 and 46/54). The 40 kDa keratin is present in most epithelia except adult epidermis (3,4).

Abnormal tissues: In pathological tissues, Listrom and Dalton (7) tested clones AE1/AE3 on over 60 poorly differentiated epithelial neoplasms, lymphomas, melanomas and sarcomas. Except for staining of only 2/6 cases of small cell carcinoma and 3/5 transitional cell carcinoma, the study found all of 34 epithelial neoplasms to stain positively. When positive, AE1/AE3 stained transitional cell carcinomas only weakly and staining of the tumor cells was either diffusely cytoplasmic or perinuclear. Montag et al. (8) found AE1/AE3 to be a sensitive reagent for the differential diagnosis of diffuse malignant mesothelioma of the sarcomatoid (spindle-cell) type (positive in 30/30 cases) from other types of spindle cell neoplasms (0/49). When compared with anti-EMA in a study of 87 neoplasms, including 48 adenocarcinomas of various types, Pinkus et al. (6) found AE1/AE3 to stain 33% of the cases more reliably than the anti-EMA.

Although 3/3 cases of chondroid chordoma and 1/8 cases of lymphoma were reactive with anti-AE1/AE3, no positive staining was observed among 25 non-epithelial neoplasms including 4 cases each of melanoma and glioblastoma (7). No cytokeratin was detected in 8 cases of nonepithelial tumors, including melanoma, lymphoma, neurofibroma, and sarcoma when AE1/AE3 was used in the immunoblot technique (9). However, it was recommended (7) that AE1/AE3 serve as a member of an antibody panel for the determination of cell lineage in cases of poorly differentiated small cell neoplasms.

Français — Réf. IS053

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, clone AE1/AE3, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps est utile pour l'identification de tumeurs telles que les carcinomes ou les tumeurs d'origine épithéliale (1-3). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication

Les cytokératines sont une famille de protéines hydrosolubles dont le poids moléculaire est compris entre 40 et 70 kDa, qui constitue le cytosquelette des cellules épithéliales. Au moins 19 cytokératines différentes ont été identifiées et peuvent être classées en deux sous-groupes. La sous-famille A comprend les cytokératines relativement acides (pH inférieur à 5,5) tandis que les membres de la sous-famille B ont un pH relativement basique au moins égal à 6.

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : AE1/AE3 Isotype : IgG_1, kappa

Immunogène

Callosités humaines de peau (1)

Spécificité

AE1/AE3 est un cocktail de deux anticorps monoclonaux qui ont été obtenus en immunisant des souris avec des kératines de callosités humaines (2). Il a été observé que le cocktail AE1/AE3 permet d'identifier la majorité des cytokératines humaines et peut donc être utilisé comme outil d'identification IHC positive des cellules d'origine épithéliale simples et stratifiées (1,2,4). L'anticorps AE1 réagit de manière immunologique à un déterminant antigénique présent sur la plupart des cytokératines de la sous-famille A, notamment les cytokératines 10, 13, 14, 15 16 et 19 de la classification de Moll (4) (poids moléculaire de 56,5, 54', 50, 50', 48 et 40 kDa, respectivement) mais non sur les cytokératines 12, 17 et 18 (55, 47 et 45 kDa) (4). L'anticorps AE3 réagit à un déterminant antigénique commun aux cytokératines de la sous-famille B, notamment les cytokératines 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 (poids moléculaire de 65, 67, 64, 59, 58, 56, 54 et 52 kDa, respectivement (5).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010/K8014).

Coupes déparaffinées : Le pré-traitement des coupes de tissus déparaffinés fixés au formol et inclus en paraffine est recommandé à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de pré-traitement indiquée dans la notice pour la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010/K8014). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C; température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pour 20 (±1) minutes ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Rincer les coupes avec un EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x), dilué à température ambiante (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010).

Coupes incluses en paraffine : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois que la procédure de coloration est terminée, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ou lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (Réf. S3003).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µl) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µl)

Autoprogram (sans contre-coloration) : panCK ou Autoprogram (avec contre-coloration) : panCKH

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu positif doit comprendre la muqueuse squameuse et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est cytoplasmique.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : L'analyse de 30 tissus sains différents a révélé une coloration positive dans le cytoplasme de l'épithélium squameux et colonnaire du col de l'utérus, du côlon, de l'œsophage, de la peau, de l'intestin grêle, de l'estomac et de l'amygdale. D'autres tissus colorés incluaient le tissu glandulaire (sein, parathyroïde, prostate, glande sudoripare et thyroïde), les astrocytes, la matière blanche du cervelet, les filaments gliaux du cerebrum, le tubule distal et la capsule de Bowman du rein, le canal cholédoque, les pneumocytes, les bronches, le mésothélium, le canal interlobulaire du pancréas, les cellules de adénohypophyse, le canal interlobulaire et les cellules acinaires de la glande salivaire, les cellules réticulaires et les corpuscules de Hassall situés dans le thymus, ainsi que l'endomètre et le muscle lisse de l'utérus (6). Une coloration négative a été observée pour la glande surrénale, la moelle osseuse, le cœur, le péricarde, le nerf périphérique, le muscle squelettique, la rate et le testicule.

L'anticorps AE1/AE3 réagit à l'épiderme kératinisé (56,5/65-67) et cornéen (55/64), à l'épithélium squameux stratifié des organes internes (51/59), à l'épithélium stratifié (50/58), aux kératinocytes hyperprolifératifs (48/56) et à l'épithélium simple (45/52 et 46/54). La kératine de 40 kDa est présente dans la plupart des épithéliums à l'exception de l'épiderme chez l'adulte (3,4).

Tissus tumoraux : Dans les tissus pathologiques, Listrom et Dalton (7) ont testé les clones AE1/AE3 sur plus de 60 néoplasmes, lymphomes, mélanomes et sarcomes d'épithélium mal différenciés. Si l'on excepte la coloration de 2 cas de carcinome à petites cellules sur 6 et de 3 cas de carcinome à cellules transitionnelles sur 5, l'étude a révélé que les 34 néoplasmes épithéliaux se sont colorés positivement. Pour les cas positifs, l'AE1/AE3 a coloré les carcinomes à cellules transitionnelles seulement faiblement et la coloration des cellules tumorales était périnucléaire ou cytoplasmique diffuse. White, et al. (8) ont démontré que l'AE1/AE3 était un réactif sensible permettant le diagnostic différentiel des mésothéliomes malins diffus de type sarcomatoïde (cellules fusiformes) (positif dans 30 cas sur 30) et des néoplasmes à cellules fusiformes d'autres types (0 cas sur 49). Par comparaison avec l'anti-EMA dans une étude portant sur 87 néoplasmes, incluant 48 adénocarcinomes de divers types, Pinkus et al. (6) ont découvert que l'AE1/AE3 colore 33 % des cas de manière plus fiable que l'anti-EMA.

Bien que 3 cas sur 3 de chordome chondroïde et 1 cas sur 8 de lymphome étaient réactifs à l'anti-AE1/AE3, aucune coloration positive n'a été observée sur 25 néoplasmes non épithéliaux, dont 4 cas de mélanome et de glioblastome (7). Aucune cytokératine n'a été détectée dans 8 cas de tumeurs non épithéliales, incluant des mélanomes, lymphomes, neurofibromes et sarcomes, lorsque l'AE1/AE3 a été utilisé dans la technique de l'immunoblot (9). Cependant, il est recommandé (7) d'utiliser l'AE1/AE3 comme l'un des anticorps du panel pour déterminer la lignée cellulaire dans les cas de néoplasmes à petites cellules mal différenciés.

Deutsch

Code-Nr. IS053

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, Clone AE1/AE3, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper dient zur Identifizierung von Tumoren mit karzinomem oder epithelialem Ursprung (1–3). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Bei den Zytokeratinen handelt es sich um eine Familie wasserlöslicher Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 40 und 70 kDa, die das Zellgerüst von Epithelzellen bilden. Bisher sind mindestens 19 verschiedene Zytokeratine nachgewiesen worden, die in zwei Unterfamilien aufgeteilt werden. Zur Unterfamilie A gehören relativ saure (pH < 5,5), zur Unterfamilie B dagegen relativ basische (pH = 6 oder höher) Zytokeratine.

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L NaN_3 enthält.

Klon: AE1/AE3 Isotyp: IgG1, Kappa

Immunogen

Kallus der humanen Epidermis (1)

Spezifität

AE1/AE3 ist ein Cocktail aus zwei monoklonalen Antikörpern, die durch die Immunisierung von Mäusen mit humanen Kalluskeratinen gewonnen wurden (2). Da die meisten humanen Zytokeratine mit AE1/AE3 nachweisbar waren, kann dieser Cocktail zum positiven IHC-Nachweis von Zellen aus einfachem und geschichtetem Epithel eingesetzt werden (1,2,4). Der Antikörper AE1 ist immunreaktiv auf eine Antigendeterminante, die bei der Mehrzahl der zur Unterfamilie A gehörenden Zytokeratine, darunter auch den Zytokeratinen mit den Nummern (4) 10, 13, 14, 15 16 und 19 nach Moll (Molekulargewicht 56,5, 54', 50, 50', 48 und 40 kDa) vorkommt, aber bei den Zytokeratinen mit den Nummern 12, 17 und 18 (55, 47 und 45 kDa) (4). Der Antikörper AE3 reagiert mit einer bei den Zytokeratinen der Unterfamilie B mit den Nummern 1 und 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 (Molekulargewicht von 65, 67, 64, 59, 58, 56, 54 und 52 kDa) vorkommenden Antigendeterminante (5).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) ist erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010/K8014) erzielt werden.

Entparaffinierte Schnitte: Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch.

Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010/K8014) durchführen. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen lassen. Schnitte mit auf Raumtemperatur gebrachtem, verdünntem EnVision™ FLEX Wash Buffer (10x) (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010) abspülen.

Paraffineingebettete Schnitte: Zur Probenpräparation kann für Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link auch ein modifiziertes Verfahren verwendet werden. Weitere Informationen siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Fixiermittels auf die Objektträger aufgebracht werden.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µl Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µl Abgabevolumen)

Autoprogram (ohne Gegenfärbung): panCK oder Autoprogram (mit Gegenfärbung): panCKH

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz“-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz“-Schritt auf „Keine“ einstellen. Dies gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte squamöse Mukosa enthalten und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: Tests an 30 verschiedenen gesunden Geweben ergaben eine positive Färbung des Zytoplasmas beim Platten- und Zylinderepithel von Zervix, Dickdarm, Speiseröhre, Haut, Dünndarm, Magen und Mandeln. Weitere Gewebearten, die eine Färbung zeigten, waren Drüsengewebe (Brust, Nebenschilddrüse, Prostata, Schweißdrüse und Schilddrüse), Astrozyten, weiße Hirnsubstanz, zerebrale Gliafasern, distaler

Tubulus und Bowman-Kapsel der Niere, Gallengang, Alveolarzellen, Bronchien, Mesothel, Ductulus interlobularis des Pankreas, Hypophysenvorderlappen-Zellen, Ductulus-interlobularis- und Azinuszellen der Speicheldrüse, Retikulumzellen und Hassall'sche Körperchen der Thymusdrüse sowie Zellen aus dem Endometrium und der glatten Muskulatur des Uterus (6). Negative Färbung wurde bei Nebennieren, Knochenmark, Herz, Perikard, peripheren Nerven, Skelettmuskulatur, Milz und Hoden beobachtet.

Anti-AE1/AE3 reagiert mit keratinisierter (56,5 von 65–67) und kornealer (55 von 64) Epidermis, geschichtetem Plattenepithel (51 von 59) innerer Organe, Schichtepithel (50 von 58), hyperproliferativen Keratinozyten (48 von 56) und einfachem Epithel (45 von 52 und 46 von 54). Das 40-kD-Keratin liegt in der Mehrzahl der Epithelgewebe mit Ausnahme der adulten Epidermis vor (3,4).

Pathologisches Gewebe: In pathologischen Geweben haben Listrom und Dalton (7) die Klone AE1/AE3 bei mehr als 60 schlecht differenzierten Epitheltumoren, Lymphomen, Melanomen und Sarkomen nachgewiesen. Abgesehen von kleinzelligen Karzinomen, bei denen nur in 2 von 6 Fällen eine Färbung auftrat, und Übergangsepithelkarzinomen, bei denen 3 von 5 eine Färbung zeigten, ergab die Studie eine positive Färbung bei allen 34 Epitheltumoren. Bei einem positiven Ergebnis färbte AE1/AE3 Übergangsepithelkarzinome nur schwach, wobei entweder eine diffuse zytoplasmatische oder perinukleäre Färbung der Tumorzellen auftrat. Montag et al. (8) wiesen nach, dass AE1/AE3 ein empfindliches Reagenz für die Differenzialdiagnose von diffusen malignen Mesotheliomen vom sarkomatoiden (Spindelzell)-Typ (positiv in 30 von 30 Fällen) und anderen Arten von Spindelzelltumoren ist (0/49). In einer Anti-EMA-Vergleichsstudie an 87 Neoplasmen, darunter 48 Adenokarzinome unterschiedlicher Typen, wiesen Pinkus et al. (6) nach, dass AE1/AE3 in 33 % der Fälle zuverlässiger einfärbt als Anti-EMA.

Obwohl 3 von 3 der Fälle von chondroidem Chordom und 1 von 8 der Lymphomfälle mit Anti-AE1/AE3 reagierten, trat bei 25 Nicht-Epithel-Neoplasmen, darunter 4 Fälle sowohl von Melanomen als auch Glioblastomen, keine Färbung auf (7). Bei acht Nicht-Epithel-Tumoren, darunter Melanom, Lymphom, Neurofibrom und Sarkom, war bei Verwendung von AE1/AE3 im Immunoblot-Verfahren kein Zytokeratin nachweisbar (9). Allerdings wird die Aufnahme von AE1/AE3 in ein Antikörper-Panel zur Bestimmung der Zellabstammung in Fällen schlecht differenzierter kleinzelliger Neoplasmen empfohlen (7).

References
Bibliographie
Literaturangaben

1. Tseng SCG, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TTl. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. Cell 1982; 30:361
2. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. J Cell Biol 1982; 95:580
3. Moll R, Franke WW, Schiller Dl. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982; 31:11
4. Sun T-T, Eichner R, Schermer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: A unifying model. In: Levine A, Topp W, Vande Woude G, Watson JD (eds.). Cancer cells 1 the transformed phenotype. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1984
5. Eichner R, Bonitz P, Sun T-T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. J Cell Biol 1984; 98:1388
6. Pinkus GS, Etheridge CL, O'Connor EM. Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? Amer J Clin Pathol 1986; 85:269
7. Listrom MB and Dalton LW. Comparison of keratin monoclonal antibodies MAK-6, AE1:AE3 and CAM-5.2. Amer J Clin Pathol 1987; 88:297
8. Montag AG, Pinkus GS, Corson JM. Keratin protein immunoreactivity of sarcomatoid and mixed types of diffuse malignant mesothelioma: An immunoperoxidase study of 30 cases. Hum Pathol 1988; 19:336
9. Nelson WG, Battifora H, Santana H and Sun T-T. Specific keratins as molecular markers for neoplasms with a stratified epithelial origin. Canc Res 1984; 44:1600

REF Catalogue number / Référence du catalogue / Bestellnummer	Temperature limitation / Limites de température / Zulässiger Temperaturbereich	IVD In vitro diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum
Manufacturer / Fabricant / Hersteller	LOT Batch code / Code du lot / Chargenbezeichnung	Σ Contains sufficient for <N> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Inhalt ausreichend für „n' Ansätze
Use by / Utiliser jusque / Verwendbar bis	Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten	EC REP Authorized representative in the European Community / Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne / Autorisierter Repräsentant in der EU

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA
Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark
Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.dako.com

PT0020/ Rev C

Edition 09/07